Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

IMMUNHISTOCHEMISCHE LOKALISATION VON HCG-REZEPTOREN IN DEN OVARIEN ALLOXAN-DIABETISCHER RATTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

NAY-IE KWEE
aus Surabaja (Indonesien)

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Buchholz

IMMUNHISTOCHEMISCHE LOKALISATION VON HCG-REZEPTOREN IN DEN OVARIEN ALLOXAN-DIABETISCHER RATTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

NAY-IE KWEE
aus Surabaja (Indonesien)

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 22. 9. 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Neurath
Referent: Prof. Dr. A. Uhlarik
Correferent: Prof. Dr. E. Daume

INHALTSVERZEICHNIS

A.	Einleitung	1
B.	Material und Methode	11
	- Die Reagentien	13
	- Methoden	15
	- Immunhistochemisch	15
	- Zytophotometrisch	18
C.	Ergebnisse	
	- Gewichtsunterschiede	23
	- Histologische Befunde	23
	- Mikrophotometrische Ergebnisse	24
	- Abbildungen	31
D.	Diskussion	26
E.	Zusammenfassung	43
F.	Literaturverzeichnis	45

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0087

A. EINLEITUNG

Neue, analytische Verfahren für die Bestimmung für Proteo- und Steroid-Hormonen haben das Verständnis der endokrinen Reglerfunktion während des menstruellen Zyklus wesentlich erweitert. Die Empfindlichkeit dieser Ultramicromethoden reicht bis in die Bereiche von einigen mIE/ml für Proteohormone und einigen pg/ml für die Steroidhormone. Für die Steuerung, der im Ovar ablaufenden zyklischen Vorgänge, sind komplexe Reglermechanismen verantwortlich. Hypothalamus, Hypophysenvorderlappen und Ovar spielen dabei gleichermaßen wichtige Rollen. Die Vorstellung von einer zentralen Regulation durch eine hypothalamische Uhr, die allen anderen Funktionen übergeordnet ist, wird den heutigen Erkenntnissen nicht mehr gerecht.

Im Hypothalamus existieren bei weiblichen Individuen zwei Sexualzentren. Erstens ein tonisches Sexualzentrum und zweitens ein zyklisches Sexualzentrum. Männliche Individuen besitzen nur ein tonisches Sexualzentrum. Dieser Geschlechtsunterschied ist genetisch nicht determiniert. Beide Sexualzentren sind primär bei beiden Geschlechtern angelegt, aber beim männlichen Individuum wird das zyklische Sexualzentrum durch die Einwirkung von Testosteron aus den fetalen, bzw. neonatalen Hoden irreversibel inaktiviert. Die Sexualzentren sind der Hypophyse übergeordnet und sezernieren die sogenannten "Releasing-Factors" (RF), die neuerdings als Releasing-Hormon (RH) bezeichnet werden. Diese thermostabilen Polypeptide gelangen über das hypophysäre Portalgefäßsystem in den Hpoyphysenvorderlappen und induzieren die Freisetzung der hypophysären Gonadotroph-Hormone, namentlich des Follikelstimulierenden-Hormons und des Luteinisierungs-Hormons.

Die Releasing-Hormone, im Gegensatz zu den hypophysären Troph-Hormonen, die in der Hypophyse in größeren Mengen zu finden sind, werden im Hypothalamus nur in sehr geringen Mengen gespeichert. Ein FSH, sowie LH-Releasing-Hormon konnten bisher nicht voneinander getrennt werden. Eine Identität wird vermutet. Diese Polypeptide sind offenbar nicht Art-spezifisch.

Die von der Hypophyse stammenden Gonadotropine steuern die zyklischen Veränderungen im Ovar. Während der Passage durch die Ovarien werden die Gonadotropine teilweise "verbraucht", möglicherweise zu Gonadotropin-Rezptoren gebunden. Die zyklische Fluktuation der Gonadotropinproduktion ist für das Luteinisierungs-Hormon, und heute auch wohl schon für das Follikel-stimulierendes-Hormon bekannt. Auf die Ausschüttung der hypophysären Gonadotroph-Hormone reagiert das Ovar mit Follikelwachstum, folglich Oestrogenproduktion, Ovulation und anschließend Progesteronproduktion durch den Gelbkörper. Oestrogene werden im Ovar in Theka-Interna-, teils auch in Granulosa-Zellen, Progesteron in den Granulosa- und Luteinzellen produziert. Für die geringe Androgenproduktion der Ovarien werden die Stroma-, bzw. Hilus-Zellen verantwortlich gemacht. Die Produktion der Oestrogene von der Ovulation ist ein direkter Parameter für das Follikelwachstum und Follikelreifung und somit kann sie für diagnostische Zwecke benutzt werden. Die Produktion von Progesteron während der Lutealphase ist ein direkter Parameter für den Luteinisierungsprozess und die endokrine Funktion des Corpus-luteums.

Es bestehen Reglerfunktionen zwischen Ovar und Hypothalamus, sowie Hypophysenvorderlappen. Die Rückwirkung der ovariellen

Steroide auf die hypothalamischen Sexualzentren erfolgt nach zwei verschiedenen Prinzipien.

Erstens eine negative Rückkopplung (feedback-Mechanismus) wobei die ovariellen Oestrogene, die Produktion des Releasing-Hormons im tonischen Sexualzentrum, und somit die Freisetzung des Follikel-stimulierendes-Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen hemmen. Durch diesen Mechanismus wird die Basis-Sekretion von FSH und LH reguliert.

Das zweite Prinzip ist der positive Rückkopplungsmechanismus. Darunter versteht man, daß Oestrogene und Progesteron unter geeigneten Bedingungen auch eine reaktive Erhöhung der Gonadotropinproduktion verursachen können. Durch diesen Mechanismus wird das zyklische Sexualzentrum aktiviert. Bei männlichen Individuen gibt es nach den heutigen Erkenntnissen keinen positiven Rückkopplungsmechanismus. Das Konzept der endokrinen Regulation des weiblichen Zyklus wird heute folgendermaßen beschrieben: als "primum movens" setzt das tonische Sexualzentrum die zyklischen Vorgänge in Gang. FSH-Releasinghormon wird im tonischen Sexualzentrum sezerniert und verursacht die Freisetzung der hypophysären FSH. Die angestiegenen Plasma-FSH-Konzentration stimuliert in beiden Ovarien das Wachstum einer Follikelgeneration. Aus morphologischen Studien ist bekannt, daß in jedem Zyklus in beiden Ovarien eine größere Zahl von Follikel bis zu den verschiedensten Reifestadien heranwächst. Aus jeder Follikelgeneration reift aber nur ein einzelnes zum Sprung reifes Graaf'sches Follikel heran. Die "Begleitfollikel" gehen durch die Follikel-Atresie zugrunde. Das Follikelwachstum und Follikel-Atresie verlaufen während des Zyklus in zwei Schüben, in der Proliferationsphase und einige Tage

nach der Ovulation in der frühen Lutealphase. Das normale Schicksal eines Follikels ist die Atresie, die Reifung bis zur Ovulation ist die Ausnahme. Seit Jahrzehnten existieren klinische Beobachtungen und morphologische Untersuchungen, die darauf hinweisen, daß beim Menschen die Ovulation regelmäßig zwischen den beiden Ovarien alterniert. Schon Hyrtl fand bei der Obduktion eines jungen Mädchens, das bis zu seinem Tode 8 Menstruationen hatte, in jedem Ovar 4 Corpus-luteum-Narben. Auch nach einer Schwangerschaft erfolgt die Ovulation in dem Ovar, das nicht das Corpus-luteum-graviditatis enthielt. Intra- und interovarielle Reglerfunktion sind für die alternierende Mono-Ovulation verantwortlich. Die Steroidsekretion des Corpus-luteum im Trägerovar hemmt lokal das Wachstum der neuen Follikelgeneration, im kontralateralen Ovar erhalten die neuen Follikel dagegen einen Wachstumsvorsprung. Die wechselseitige Funktion ist somit erklärlich. Bei der Follikelsekretion - welche von den vielen Follikeln zur Ovulation kommt - spielt die lokale suppressive Wirkung der Oestrogene eine Rolle. Durch einen noch unbekannten Selektionsmechanismus erreicht ein Follikel ein Entwicklungsstadium, das nicht mehr durch Oestrogene gehemmt werden kann. Somit wird dieses Follikel dem Suppressionsmechanismus entzogen und kann zur Ovulation gelangen.

Die ansteigende Oestrogenproduktion in den Ovarien bewirkt durch einen negativen Feedback-Effekt über das tonische Sexualzentrum eine Verringerung der hypophysären FSH-Ausschüttung. Die Basis-Sekretion des FSH-LH wird nicht beeinflußt Die ansteigende Oestrogenproduktion des selektiven Follikels verursacht ein praeovulatorisches Maximum von Plasma-Oestradiol (100 - 600 pg/ml) und aktiviert das zyklische Sexualzentrum durch positiven Feedback. Das zyklische Sexualzentrum bewirkt durch Produktion von Releasinghormon eine LH-Ausschüttung

aus dem Hypophysenvorderlappen, die in dem selektiven Follikel eine praeovulatorische Theka-interna-Luteinisierung hervorruft. Diese praeovulatorisch luteinisierten Theka-interna-Zellen produzieren schon praeovulatorisch Progesteron. Das Progesteron verursacht durch einen erneuten, positiven Feedback-Mechanismus eine zweite LH-Ausschüttung, die schließlich die Ovulation auslöst. Die Ovulation erfolgt etwa 40 Stunden nach dem ersten LH-Anstieg. Nach der progesteroninduzierten zweiten positiven Rückkopplungsreaktion ist das zyklische Sexualzentrum gegenüber erneuter Aktivierung durch Oestrogen und Progesteron refraktär. Die Anovulation in der Corpus-luteum-Phase ist dadurch gewährleistet. Nach Abklingen des zweiten Luteinisierungshormon-Ausschüttungsgipfel bleibt eine Basis-LH-Sekretion erhalten, die luteotrop wirkt und für die Funktion des Corpus-luteum verantwortlich ist. Die im Corpus-luteum produzierten Oestrogene wirken nach Überschreitung einer Konzentrationsschwelle luteolytisch. Durch die Luteolyse wird die Funktion des Corpus-luteum rasch gedrosselt. Die Luteolysine sind wahrscheinlich Prostaglandine (ungesättigte oxygenierte C_{20}-Fettsäure), deren Biosynthese durch Oestrogene stimuliert werden kann. Der Abbruch der normalen Corpus-luteum-Funktion kann im Experiment mit HCG oder LH verhindert werden. Unter physiologischen Bedingungen wird die Luteolyse beim Eintritt einer Gravidität durch die trophoblastische HCG-Produktion verhindert.

In den letzten Jahren sind verschiedene Methoden entwickelt worden, Gonadotroph-Hormone im Gewebe zu lokalisieren. Verbreitet ist die Technik, die Gonadotroph-Hormone mit Fluorochrome-markierten Antikörper durch immunochemische Reaktion darzustellen. Auch die Markierung mit Isotopen ist versucht worden. Weder die Immunofluoreszenz-Methode noch die Auto-

radiographie erlauben jedoch eine präzise histologische Lokalisation des Proteo-Hormons im Gewebe. Mit diesen Methoden gewonnene Präparate sind ausserdem instabil und es kommt mit der Zeit zu erheblichem Aktivitätsverlust.

E. Vazques et al (1966) (37,38) stellten durch fluoreszenzmikroskopischen Nachweis fest, daß die Human-Chorionic-Gonadotropin (HCG)-Bindungskapazität in Rattenovarien durch synthetische Steroide beeinflußbar ist. Mit dieser Methode konnte Vazques zwar die Anreicherung von HCG in bestimmten Bereichen der Ovarien nachweisen, jedoch war damit die Differenzierung zwischen Bindung von HCG im intra- oder extrazytoplasmatischen Raum nicht möglich. Um diesen Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie auszugleichen, ersetzten Graham und Karnovsky (1966) (9) den Fluoreszenzfarbstoff durch das histochemisch leicht darstellbare Enzym Peroxidase. Es folgten modifizierte Verfahren nach Nakane und Pierce (1967) (23) und Sternberger (1969) (34). Im Jahre 1973 verwendeten Petrusz und Uhlarik (25) eine ähnliche Methode, um die HCG-Bindungsstellen in den Rattenovarien nachzuweisen. Sie inkubierten je 1 Stunde lang die histologischen Schnitte der Rattenovarien nacheinander mit HCG, Anti-HCG und Peroxidase-markierten Anti-Rabbit-Gammaglobulin (A-RGG). Schließlich wurde die an das A-RGG gebundene Peroxidase histochemisch mit 3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid in Anwesenheit von H_2O_2 sichtbar gemacht.

Durch langjährige, klinische Erfahrung weiß man, daß bei nicht behandelten oder schlecht eingestellten Diabetikerinnen die Konzeptionsrate deutlich erniedrigt ist. Als Ursache dafür wird eine gestörte Ansprechbarkeit der Ovarien auf Gonadotropine vermutet.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der oben erwähnten Methode die HCG-Bindungsfähigkeit von Rattenovarien bei Alloxan-diabetischen Ratten untersucht.

Alloxan ist ein bekanntes Mittel mit dem man experimentell einen Diabetes induzieren kann, der auf Grund einer Schädigung der ß-Zellen des Pankreas zustande kommt. Es ist auch berichtet worden, daß Alloxan einen toxischen Effekt am Nieren- und Lebergewebe verursacht (Rerup 1970) (28). Ebenfalls ist eine Zunahme des Gewichtes der Nebennieren und des Plasmacorticoidspiegels durch die Wirkung von Alloxan von Saba und Hoet (1962) (29) beschrieben worden. Die Erhöhung des Glucocorticoid-Plasmaspiegels bewirkt eine Hemmung der Glucoseverwertung im Blut. Es kommt deshalb zu einer Erhöhung der Gluconeogenese aus Aminosäuren, die mit der Nahrung dem Organismus zugeführt werden. Dadurch kommt es zu einer verminderten Proteinsynthese und in der Bilanz zu einer Verminderung des Körper-Eiweißbestandes; "Eiweiß-katabole Wirkung". Infolgedessen ist auch das Körperwachstum vermindert. Auf Grund der vermehrten Zuckerneubildung steigt der Blutzuckerspiegel und die Glucogenbildung in der Leber. Diese Veränderung des Kohlehydratstoffwechsels entspricht teilweise einem Insulinmangel. Bei Insulinmangel verlassen die nicht verwerteten Aminosäuren die Zellen und werden in der Leber in den Kohlehydratstoffwechsel eingeschleust. Es entsteht somit zusätzlich Glucose, die von der Leber laufend ins Blut abgegeben wird und den Serumglucosespiegel ständig erhöht. Dieser hohe Glucosespiegel im Blutplasma bewirkt wiederum eine Funktions- und Stoffwechselstörung des gesamten Organismus.

Eine Hyposekretion der Gonadotropine in mit Alloxan behandelten , männlichen Ratten wurde von Howland und Zebrowski (1972) (10) beobachtet. Sowohl die Hormonsynthese als auch die Hormonfreisetzung ist beeinträchtigt. Der Effekt der Alloxanbehandlung auf die Ovarien und den Gonadotropinspiegel im Plasma ist bei jüngeren Ratten größer als bei älteren. Durch Alloxan ist bei älteren Ratten primär der Hormonfreisetzungsmechanismus gestört. Insbesondere bei weiblichen, diabetischen Ratten zeigt Alloxan einen solchen Effekt. Ausser einem erniedrigten Gonadotropinspiegel im Blut ist zusätzlich die Ansprechbarkeit des Ovarialgewebes auf Gonadotropine vermindert. Die diabetischen Tiere nahmen etwa 15 g an Körpergewicht zu, verloren aber an Ovarialgewicht (Liu et al 1972) (21). Die Alloxan-diabetischen Ratten hatten - besonders während der ersten Tage nach Alloxangabe - eine deutlich verminderte Nahrungsaufnahme. Sowohl eine Verminderung der Nahrungszufuhr, als auch ein vermindertes Wachstum wurde während der ersten Tage nach der Alloxan-Behandlung beobachtet. Die Verminderung des Ovarialgewiches bei Alloxan-diabetischen Ratten kann durch Insulindefizit, durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme oder eine Malnutrition als Ergebnis eines gestörten Protein-, Fett- und Kohlehydratstoffwechsel verursacht sein. Es kann auch möglich sein, daß ein oder mehrere der oben erwähnten Faktoren eine Abnahme in der Sekretion von hypophysärem Gonadotropin oder eine Abnahme der Ovarial-Ansprechbarkeit auf hypophysäre Gonadotropin-Stimulation bei diabetischen, sexuell noch nicht vollentwickelten, weiblichen Ratten verursacht haben.

Wurden FSH und HCG juvenilen, weiblichen Ratten zusammen verabfolgt, war die Zunahme der Ovarialgewichte größer als bei Verabreichung von nur FSH oder nur HCG (Steelman und Pohley 1953) (32).

Der Ovarialmetabolismus von Alloxan-diabetischen, juvenilen Ratten zeigt eine Reduktion in der Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamid-diphosphohydrogenase (NADPH), eine Zunahme im Lactat/Pyruvatquotienten, eine Reduktion im ATP/ADP-Quotienten, eine Reduktion im Aktivitätsspiegel des Wasserstoff-übertragenden Enzym G-6-P-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase, eine Zunahme des Aktivitätsspiegels der alkalischen Phosphatase und eine Reduktion des Proteingehaltes (E. Stähler) (31).

NADPH ist ein wichtiges Coenzym für die Ovarial-Steroidbiosynthese, das hauptsächlich durch gonadotropininduzierte Aktivität des Pentosephosphatzyklus produziert wird. Das Schlüsselenzym, das dafür verantwortlich ist, ist die G-6-P-Dehydrogenase. Die Aktivität nimmt unter LH beträchtlich zu (Kidwell, Balough 1966) (13). Kürzlich wurde ein Gonadotropinrezeptor von hoher Spezifität und augenscheinlich hoher Affinität für Human-Lutein-Hormon und Human-Chorionic-Gonadotropin-Hormon in Rattentestis und Rattenovarien, sowie in menschlichen Ovarien demonstriert (Catt et al 1971) (3), (de Kretser et al 1971) (5), (Lee und Ryan 1971, 1973) (15,18). Die Bindung von LH und HCG am Rezeptor verlangt native Moleküle. Die LH-Rezeptor-Wechselwirkung ist abhängig von Zeit, Temperatur und pH (Lee und Ryan 1972) (16). An der Zellmembran von Rinder-Corpus-luteum-Zellen zeigte sich, daß die Bindung von J^{125}-HCG in Gegenwart von freiem, unmarkiertem HCG, bzw. LH in einer dosisabhängigen Weise gehemmt wurde. Das Maximum der spezifischen Bindung von J^{125}-HCG am Rezeptor lag bei pH 6,2 und 30° - 36° C, im Gegensatz dazu lag das Maximum für die unspezifische Bindung bei pH 4,0 (Rao, Ch.V. 1973) (26). Alle oben genannten Unter-

suchungen über Gonadotropin-Rezeptoren sind mit homogenisiertem Material und radioaktiv-markiertem HCG durchgeführt worden.

Die ovarielle Hypofunktion von Frauen, die an Diabetes mellitus leiden, ist bekannt, während die morphologischen Veränderungen an den Ovarien noch kaum untersucht sind. Amar und Ded (1966) (1) untersuchten die Ovarien von weißen Ratten unter der Bedingung von Alloxan-Diabetes. Sie fanden eine funktionelle Insuffizienz der Corpora-lutea, die durch den kompletten Mangel an Vitamin C in denselben verursacht wird.

Takewa und Kusheva (1972) (35) haben morphologische und histologische Veränderungen in den Ovarien von weißen Ratten, die mit Alloxan behandelt wurden, untersucht, und sie fanden dort Follikel unter der Tunica albuginea, die nicht verändert waren. Die Eizellen von fast allen wachsenden Follikeln wurden durch einen Dystrophie-Prozeß betroffen. Die Theka interna war sehr gut entwickelt und zeigte eine hohe Aktivität an Steroid 3 ß-ol-Dehydrogenase, NAD-Diaphorase und alkalischer Phosphatase. Die Granulosamembran von großen Follikeln mit entwickelten Antra zeigte verschiedene Stufen von Destruktion und eine hohe Affinität mehrerer Enzyme.

In Anlehnung an die Arbeit von Petrusz und Uhlarik (1972) (25) und Lengerke (1975) (19) soll in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Alloxan-Diabetes auf die HCG-Bindungsfähigkeit der Ovarien unter verschiedenen, experimentellen Bedinungen untersucht werden.

B. MATERIAL und METHODE

Die Versuche wurden an weiblichen, juvenilen Sprague-Dawly Ratten im Alter von 29 - 40 Tagen durchgeführt. Entsprechend der Vorbehandlung wurden die Ovarien der untersuchten Ratten in 6 Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: Ovarien von 30 Tage alten Ratten, die am 20. Lebenstag eine einmalige Injektion von 12 mg Alloxan/100 g Körpergewicht subcutan erhielten. (6 Tiere)

Gruppe II: Vergleichsgruppe zu Gruppe I: Anstelle von Alloxan wurde 0,9 % NaCl subcutan injiziert.

Gruppe III: Ovarien von 29 Tage alten Ratten, die am 20. Lebenstag 12 mg Alloxan/100 g Körpergewicht subcutan, am 21. Tag 50 IE PMS (Stutenserumgonadotropin) und an 26. Tag 25 IE HCG (Human-Chorionic-Gonadotropin) subcutan injiziert bekamen.

Gruppe IV: Vergleichsgruppe zu Gruppe III: Anstelle von Alloxan wurde 0,9 % NaCl subcutan gespritzt.

Gruppe V: Ovarien von 40 Tage alten Ratten, die am 18. Lebenstag 12 mg Alloxan/100 g Körpergewicht subcutan erhielten.

Gruppe VI: Vergleichsgruppe zu Gruppe V: Anstelle von Alloxan wurde NaCl verwendet.

Tab. 1

Gruppe		Alter der Ratten	subcutane Injektion von	Zahl der Ratten
I	Alloxan-Diabetes	30 Tage	Alloxan 12mg/100g Körpergewicht	6
II	Kontrolle	30 Tage	0,9% Kochsalzlösung	4
III	Alloxan-Diabetes + stimuliert	29 Tage	Alloxan 12mg/100g Körpergewicht; 25IE HCG; 50IE PMS	6
IV	nur Hormon-stimulation	29 Tage	50 IE PMS; 25 IE HCG	6
V	Alloxan-Diabetes	40 Tage	Alloxan 12mg/100g Körpergewicht	13
VI	Kontrolle	40 Tage	Kochsalzlösung	11

Die Ovarien aller auf Seite 11 beschriebenen Kontrollgruppen wurden in Äthernarkose herauspräpariert, sofort gewogen und anschließend in Formalin-PBS-Puffer (Phosphate-buffered-Saline) für mindestens 1 Woche fixiert. Vor der Einbettung in Paraffinblock wurden die Ovarien mehrmals mit PBS - insgesamt 3 Tage - gewaschen und anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt.

Aquadest	2 Stunden
70%-iger Alkohol	1 Stunde
96%-iger Alkohol	2 Stunden
96%-iger Alkohol	1 Stunde
100%-iger Alkohol	2 Stunden
100%-iger Alkohol	3 Stunden
100%-iger Alkohol	2 Stunden
Toluol I	2 Stunden
Toluol II	2 Stunden
Paraffin I	3 Stunden
Paraffin II	3 Stunden

Die in Paraffinblöcke eingebetteten Ovarien wurden 24 Stunden bei einer Temperatur von 4° C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden Ovarialschnitte von 4µm Dicke angefertigt und auf, mit Eiweiß-Glycerin vorbehandelte Objekträger, 24 Stunden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C aufbewahrt. Danach konnte die immunologische Reaktion durchgeführt werden.

D I E R E A G E N T I E N

Formalin-PBS-Puffer: 100 ml Formalin 37% -- ad 1000 ml Aquadest
4 g NaH_2PO_4
6,5 g Na_2HPO_4

PBS (Phosphate-Buffered-Saline) : 0,92 g NaH_2PO_4
3,6 g Na_2HPO_4
14,8 g NaCl
in 2000 ml Aquadest gelöst.

PBS-BSA (Bovine-Serum-Albumin): 0,1 g BSA wurden mit PBS in 100 ml gelöst.

Tris: 154,0 ml 0,1 n HCl
554,0 ml H_2O (Aqua dest)
3,025 g Tris

HCG: Human-Chorionic-Gonadotropine
1000 IU Primogonyl (Schering AG, Berlin) in 1 ml 0,1%-iger PBS-BSA

Anti-HCG: Ein in der Tierpassage (Kaninchen) gewonnenes Anti-HCG wurde im Verhältnis 1:25 mit PBS-BSA verdünnt. Diese Lösung wurde nochmals zu gleichen Teilen mit Rattenserum neutralisiert, 60 Minuten bei 37° C inkubiert, 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

Anit-RGG: Anti-Rabbit-Gamma-Globulin (Behringwerke AG, Marburg).
In der Tierpassage gewonnenes Gamma-Globulin von der Ziege wurde 1:10 mit 0,1%-iger PBS-BSA verdünnt.

RAP: Rabbit-Anti-Peroxidase
Die RAP wurde in einer Kaninchenpassage gewonnen. Zunächst wurde ein Sensibilisierungsdosis von 4 mg Peroxidase subcutan verabreicht: 4 mg gereinigter Peroxidase wurden in 1 ml steriler Kochsalzlösung und 1 ml Freud'scher Adjuvans gelöst und in Portionen zu 0,5 ml an 4 verschiedenen Stellen den Kaninchen subcutan appliziert. Vier und sechs Wochen nach der 1. Sensibilisierung wurden je 2 mg Peroxidase in

normaler Kochsalzlösung intravenös injiziert.
4 Tage nach der 2. Sensibilisierung wurde von den sensibilisierten Tieren Serum gewonnen.

Der qualitative Nachweis von Anti-Peroxidase gelang mit dem Quchterlony-Test (Mason). Die so erhaltene RAP wurde in einem Verhältnis von 1:25 mit 0,1%-iger PBS-BSA-Lösung verdünnt und in gleicher Weise wie Anti-HCG mit Rattenserum neutralisiert.

HP: Horseradish-Peroxidase
5 mg der im Handel erhältlichen Meerrettich-Peroxidase (Merck, Darmstadt) wurde in 1 ml PBS-BSA gelöst.

DAB: Diaminobenzidintetrahydrochlorid ($C_{12}H_{18}C_{14}N_4 2H_2O$)
200 mg DAB (Fluka AG, Bucks AG) auf 200 ml Tris-Puffer; kurz vor Gebrauch wurden 15 Tropfen H_2O_2 1%-ig hinzugegeben.

OsO_4: Osmiumtetraoxyd
3 - 4 Tropfen einer 2%-igen Osmiumtetraoxyd-Lösung wurden in eine feuchte Kammer gegeben.

Toluidinblau: 0,1% wässrige Lösung von im Handel erhältlichem Toluidinblau (Merck, Darmstadt).

M E T H O D E N

Bevor die 4 µm dicken Ovarialschnitte mit Antiserum behandelt werden konnten, wurde das Paraffin durch Auswaschen mittels einer Alkoholreihe entfernt. Somit erfolgte Rehydrierung der Schnitte:

Alkoholreihe

2 x Xylol	je 5 Minuten
2 x 100 %-iger Alkohol	je 5 Minuten
2 x 96 %-iger Alkohol	je 5 Minuten
2 x 70 %-iger Alkohol	je 5 Minuten

Die Präparate wurden 5 Minuten im PBS-Pufferbad gewaschen und anschließend einzeln herausgenommen. Die noch auf dem Objektträger verbliebene Flüssigkeit wurde mit einem weichen Tuch entfernt. HCG wurde mittels einer Pipette in einer Konzentration von 1000 IU/ml PBS-BSA gleichmäßig auf dem Ovarienschnitt verteilt. Es erfolgte als nächster Schritt die Inkubation der Präparate für 60 Minuten bei 37° C in der Brutschrank-Feuchtkammer.

Zur Entfernung des HCG, das nicht an das Gewebe gebunden war, wurden die Präparate 3 x 5 Minuten im PBS-Pufferbad gewaschen. Anti-HCG in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS-BSA wurde zugesetzt, für 60 Minuten bei 37° C inkubiert, und der Überschuß wieder durch Waschung mit PBS-Puffer entfernt. Anti-RGG (1:10); RAP (1:50); HP (5 µg/mlPBS-BSA) wurden danach in angegebener Reihenfolge zugesetzt, ebenfalls für 60 Minuten unter gleicher Bedingungen inkubiert, und die Überschüsse durch PBS herausgewaschen.

Der spezifische Antikörper Anti-HCG geht eine Bindung mit dem am HCG-Bindungsort fixierten HCG ein. Anti-RGG reagiert mit dem Kaninchen-Immunglobulin-Anti-HCG, RAP mit Anti-RGG. Die HP wurde als Antigen an den Antikörper RAP gebunden. Die HP, die am Ende der Antigen-Antikörper-Reaktionskette steht, reagierte mit Benzidin (DAB) in einer 30-minütigen Reaktion, sodaß eine Braunfärbung der Schnitte resultierte.Überschüssiges DAB wurde durch Behandlung mit Trispuffer (5 Minuten) entfernt. Die Fixierung der Präparate

erfolgte mit Osmiumtetraoxyd (OsO_4)-Dampf (5 Minuten).

Die fixierten Schnitte wurden in PBS-Puffer für 5 Minuten gewaschen. Um ein kontrastreicheres Bild zu gewinnen, wurden die fixierten Schnitte mit Toulidinblau-Gegenfärbung für 3 Minuten gefärbt. Die Toluidinblau-Gegenfärbung gewährleistet ein schönes, kontrastreiches histologisches Bild, da die Stellen, die von HCG frei sind, durch eine intensive Blaufärbung auffallen. Die Bindungsorte von HCG erscheinen dagegen durch die abgelaufene histochemische Reaktion dunkelbraun. Die braun gefärbten Stellen, die in der Regel in den Zytoplasmen liegen, zeigen demnach eine positive Reaktion.

Bevor die Ovarienschnitte mit Eukit eingedeckt wurden, sind sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert worden.

Alkoholreihe

1 x 50 %-iger Alkohol	2 Minuten
2 x 95 %-iger Alkohol	je 3 Minuten
2 x 100 %-iger Alkohol	je 4 Minuten
2 x Xylol	je 5 Minuten

Auf diese Weise gelang es, die HCG-Bindungsstellen über eine Antigen-Antikörperkette mit einem Enzym in spezifischen Kontakt zu bringen. Durch histochemische Darstellung konnte der HCG-Rezeptor lokalisiert werden.

Die unterschiedliche Bindung von HCG, in den verschieden behandelten Tiergruppen, wurden mit einem Zytophotometer (Universalmikrospektralphotometer UMSP I, Zeiss), das mit einem Laborrechner (PDPR) gekoppelt war, quantitativ erfasst.

Mit dieser Methode sollten ausserdem Aussagen über die Bindungsspezifität von HCG in bestimmten histologischen Bereichen der Ovarien (Eizelle, Corpus-luteum, Thekazellen, Interstitium und Granulosazellen) gemacht werden. Durch diese mikrospektrometrische Methode (Bartels (2), Oster und Pollister (24), Sandritter (30)) kann die absolute Masse eines Stoffes oder seine relative Konzentration gemessen werden, indem die Absorption monochromatischen Lichtes gemessen wird. Dabei kann entweder die Absorption der Biomoleküle selbst (z.B. Desoxiribonukleinsäure (DNS) bei 254 nm im UV-Bereich) oder die Absorption eines Komplexes von Makromolekülen mit Farbstoffmolekülen (z.B. bei der Feulgenfärbung der Komplex zwischen DNS und Schiffchen-Reagenz bei 560 nm) in ihrem Absorptionsmaximum gemessen werden.

Aus der Beziehung (Lambert-Beersche-Gesetz)

$$I = Io \times e^{-cd\varepsilon}$$

läßt sich bei Kenntnis von ε die Masse (m) oder die relative Masse (m_R) angeben.

Die Extinktion: $E = \log\frac{Io}{I} = c \times d \times \varepsilon$ (1)

Die Masse: $m = c \times A \times d$ Millimol, bzw. Gramm

$$c = \frac{m}{A \times d} \quad \text{Millimol/cm}^3 \qquad (2)$$

(2) in (1) eingesetzt ergibt:

$$E = \frac{m \times d \times}{A \times d} = \frac{m \times \varepsilon}{A}$$

$$m = E \times A \times \frac{1}{\varepsilon} \text{ Millimol}$$

$E \times A$ ist die relative Masse (m_R) $\longrightarrow m = m_R \times \frac{1}{\varepsilon}$ Millimol

Da ε für den Komplex der Benzidinreaktion nicht bekannt ist, werden im Folgenden jeweils die relativen Extinktionswerte in Arbeitseinheiten (AU) angegeben.

I ist die vom homogen absorbierenden Farbstoff durchgelassene Lichtmenge
Io Ursprüngliche Lichtmenge (Vergleichsstrahlung)
ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient cm²/Millimol
E Extinktion
A Messfläche
c Konzentration Millimol/cm³
d Schichtdicke der absorbierenden Substanz
m Masse Millimol, bzw. Gramm

Als Lichtquelle benutzten wir eine Xenohochdrucklampe.

Das UMSP I ist ein Zweistrahlphotometer, wobei für das Objekt (I) und ein Vergleichswert (Io) jeweils ein getrenntes Mikroskop benutzt wird. Der heutige Stand der technischen Einzelheiten ist in der Anleitung (24) nachzulesen.

Die Messparameter für die Messung der spektralen Abhängigkeit der Absorption des Benzidin und Toluidin Komplexes waren:

Objektiv	100
Projektiv	100
Messblende	1 µm
Leuchtfeldblende	2 µm

Um einen größeren Bereich zu erfassen, werden für die eigentlichen Messungen die Parameter:

Objektiv Ultrafluer	32
Projektiv	100
Messblende	3,2 µm und
Leuchtblende	8 µm gewählt.

Da die Messungen an Toluidinblau-gefärbten Präparaten durchgeführt wurden, war es zunächst notwendig, die spezifischen Absorptionsmaxima des HP-Benzidinkomplexes zu erfassen. In der Abbildung 1a wurde die Abhängigkeit der

Extinktion von der Wellenlänge λ im Zellkern und in Abbildung 1b im Zytoplasma, und in Abbildung 1c im Untergrund dargestellt. Die Toluidinblau-Färbung zeigt ein Maximum bei 590 - 600 nm und der spezifische HP-Benzidin-Komplex ein Maximum bei 440 - 460 nm, wo fast keine oder weitgehend vernachlässigbare Extinktionswerte der Toluidinblau-Färbung resultieren.

Für die quantitative HCG-Bindung wurde daher die Absorption bei der Wellenlänge von 445 nm gemessen. Die Messung wurde über einen größeren Bereich der verschiedenen Größen, aber mindestens eine Größe von ca. 30 x 30 µm gewählt, im Scanningverfahren gemessen. Zu betonen ist, daß in den eindeutig zu charakterisierenden histologischen Bereichen (s.o.) über mehrere Zellen (Kerne und Zytoplasma) integral die Extinktionsbestimmung erfolgte. Das Messprinzip ist in der Abbildung 2a wiedergegeben. Die Abbildung 2 zeigt die Darstellung der Einzelextinktionswerte am Laborcomputer; in Abbildung 2b ist dieser Bereich nochmals eingezeichnet. In Abbildung 2c sind Messbereiche aus verschiedenen histologischen Bereichen angegeben.

Tab. 2

Gruppe	Alter d. Ratten + Behandlung	Ovargew.(mg)	Zahl d. Ovarien	Körpergew. (g)	Zahl d. Tiere
I	Alloxan-Diabetes 30 Tage	7,0 ± 1,2	9	125	6
II	Kontrolle 30 Tage	10,8 ± 1,03	8		4
III	Alloxan-Diabetes + stimuliert 29 Tage	68,3 ± 8,1	8	63,4 ± 14,7	6
IV	nur Hormonstimulation 29 Tage	93,5 ± 18,3	7	88,4 ± 9,31	6
V	Alloxan-Diabetes 40 Tage	23,6 ± 5,1	26		13
VI	Kontrolle 40 Tage	22,8 ± 4,7	22		11

Mittelwerte der Körper-, bzw. Ovargewichte bei Alloxan-diabetischen Ratten, normalen, unbehandleten Ratten als Kontrolle, Mit PMS und HCG-stimulierten Ratten und Alloxan-dibetischen-stimulierten Ratten.

Tab. 3

Gruppe	Alter d. Ratten + Behandlung	Eizelle	Theka Z.	Granul. Z.	Copus-l.Z.	Interst. Z.
I	Alloxan-Diabetes 30 Tage	74,7 ± 14,8	75,3 ± 6,5	37,7 ± 4,3	50,7 ± 4,3	72,6 ± 8,0
II	Kontrolle 30 Tage	86,9 ± 11,8	73,4 ± 6,4	39,0 ± 4,9	61,1 ± 5,5	72,0 ± 10,6
III	Alloxan-Diabetes + stimuliert 29 Tage	29	32,2 ± 4,5	25,0 ± 4,4	40,5 ± 7,4	30,5 ± 3,3
IV	nur Hormonstimulation 29 Tage	49	46,6 ± 5,1	35,0 ± 4,0	48,9 ± 4,4	51,6 ± 5,0
V	Alloxan-Diabetes 40 Tage	44,4 ± 8,4	42,2 ± 8,9	48,9 ± 14,5	62,2 ± 3,2	47,2 ± 11,5
VI	Kontrolle 40 Tage	108,4 ± 8,0	76,0 ± 5,1	48,6 ± 7,0	69,5 ± 3,0	68,7 ± 6,6

Die in der Tabelle 3 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mehreren integral Extinktionsmessungen verschiedener Präparate und aus unterschiedlichen Bereichen der entsprechenden Zellgruppen (Eizelle, Theka-, Granulosa-, Corpus-luteum-, und Interstitiellzellen) in den Ovarien.

C. ERGEBNISSE

10 Tage nach Alloxan-Injektion bekamen die Tiere eine eindeutige Glucosurie. Dies wurde durch Glucosesticks (Merck) nachgeprüft. Eine Verminderung des Ovarialgewichtes um durchschnittlich 3,60 mg zeigten die Alloxan-diabetischen Ratten (Gruppe I) im Vergleich zur Kontrolle (Gruppe II) - siehe Tabelle 2.

Ein ganz anderes Bild zeigten die Ovarialgewichte derjenigen Ratten, die 22 Tage nach Alloxan-Behandlung getötet wurden (Gruppe V): sie hatten kaum, oder fast keine Unterschiede im Vergleich zu normalen Ratten gleichen Alters (Kontrolle Gruppe IV) - siehe Tabelle 2.

Durch eine Stimulation mit PMS und HCG zeigten sowohl die Alloxan-diabetischen Ratten, als auch die nicht Alloxan-diabetischen Ratten im Vergleich zur Kontrolle (Gruppe II) eine Zunahme im Körpergewicht und Ovarialgewicht. Im Einzelnen zeigten die stimulierten Ratten ein um 24,0 g größeres Körpergewicht und ein um durchschnittlich 25,3 mg größeres Ovarialgewicht als die diabetischen Ratten, bei denen zusätzlich PMS + HCG-Stimulation erfolgte. Das immunhistologische Bild zeigt allgemein eine positive Reaktion; sie äußert sich in einer Einlagerung von dunkelbraunen Granulationen in das Zytoplasma der Luteinzellen und Interstitiellzellen, Eizellen und Thekazellen, die hier als positive Reaktion angesehen wird.

Die Corpora-lutea waren unterschiedlich intensiv gefärbt. In den Ovarialschnitten von den 30 Tage alten Alloxan-diabetischen Ratten war eine deutliche Reduzierung der

Luteinisation festzustellen. Es fanden sich unterschiedlich große Sekundärfollikel. Bei den 40 Tage alten Ratten fanden sich im Durchschnitt weniger Sekundärfollikel. Die Luteinisation in den Ovarien der 40 Tage alten Alloxan-diabetischen Ratten zeigten keine Verminderung im Vergleich zur Kontrolle (Gruppe VI).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Ratten zeigten die Alloxan-diabetischen und stimulierten Ratten (Gruppe III) und die nur stimulierten Ratten (Gruppe IV) eine stärkere Reifungstendenz der Follikel und vollständige Luteinisation.

Durch Mikrophotometrie wiesen die Ovarialschnitte der mit Alloxan behandelten Ratten (Gruppe I) eine deutliche Verminderung der Peroxidase-Reaktion der Eizellen, Granulosa- und Corpus-luteum-Zellen im Vergleich zu den Ovarien der unbehandleten Ratten (Gruppe II) auf. Besonders große Unterschiede zeigten sich in der mittleren Extinktion der Eizelllen-Differenz: 12,3 - der Corpus-luteum-Differenz:10,4. Dagegen zeigten die Granulosazellen, Thekazellen und Interstitiellzellen keinen großen Unterschied in der Stärke der Peroxidase-Reaktion im Vergleich zu normalen Ratten gleichen Alters (siehe Tabelle 3).

Der Quotient einzelner, mittlerer Extinktionswerte der Granulosa-, Theka-, Corpus-luteum-, Interstitiellzellen zu der mittleren Extinktion der Eizellen zeigten einen konstanten Wert.

Daraus folgt, daß die Bindung von HCG in den Eizellen am stärksten ist; es folgt die Bindungsrate des Hormons im Interstitium, in den Thekazellen, in Corpus-luteum-Zellen

und schließlich in den Granulosazellen.

Nicht proportional zu den Körper- und Ovarialgewichten verhält sich die Immunhistologie der Ovarien von 40 Tage alten Ratten (Gruppe V). Es bestehen größere Unterschiede in der Extinktion zur Kontrollgruppe (Gruppe VI), besonders bei den Extinktionswerten der Eizellen, Theka-, und Interstitiellzellen. Zwischen diesen beiden Gruppen betrugen die Unterschiede der mittleren Extinktion in den Eizellen 64,0; in den Thekazellen 33,8; in den Interstitiellzellen 21,5; in den Corpus-luteum-Zellen 8,3 und in den Granulosazellen 1,7 (siehe Tabelle 3). Hier zeigte sich wiederum eine stärkere HCG-Bindung sowohl in den Alloxan-diabetischen Rattenovarien als auch in den normalen Rattenovarien bei den Eizellen; es folgten in abnehmender Reihenfolge die Theka-, Interstitiellzellen und schließlich zu allerletzt die Granulosazellen (siehe Abbildung 5c). Die Gruppe der mit Alloxan und PMS+HCG behandelten Ratten (Gruppe III) zeigte insgesamt eine geringere Markierung der Ovarien. Besonders deutlich ist der Unterschied der mittleren Extinktion dieser Gruppe im Vergleich zu der Gruppe, der nur mit PMS+HCG stimulierten Ratten (Gruppe VI). Er beträgt für die Interstitiellzellen 21,0; für die Thekazellen 14,4 (siehe Tabelle 3). Auch hier zeigten die Granulosazellen in beiden Gruppen den niedrigsten Extinktionswert.

Nicht den Körper- und Ovarialgewichten entsprechend ist die HCG-Bindung. Diese ist sowohl in den Ovarien stimulierter Ratten, als auch in den Ovarien der stimulierten-Alloxan-diabetischen Ratten deutlich vermindert. Die Verminderung der HCG-Bindung trifft nicht zu für die Granulosazellen. Der Unterschied der mittleren Extinktion

von stimulierten Rattenovarien zu stimulierten-Alloxan-diabetischen Rattenovarien beträgt für die Eizellen 20,0; für die Thekazellen 14,6; für die Granulosazellen 10,0; für die Corpus-luteum-Zellen 14,6; für Interstitiellzellen 21,1 (siehe Tabelle 3).

Der durch Alloxan hervorgerufene Diabetes hat demnach einen tiefgreifenden Einsatz auf die Ovarien. Die Verminderung der HCG-Bindungsfähigkeit, wie durch Microphotometrie nachgewiesen, ist in allen Alloxan-diabetischen Tiergruppen eindeutig. Diese Wirkung ist auch durch Gonadotrophin nicht aufzuheben.

D. D I S K U S S I O N

Es ist seit langem bekannt, daß bei nicht behandelten und schlecht eingestellten Diabetikerinnen häufig Zyklusstörungen, und nur selten Schwangerschaften auftreten. Eine genaue Ursache für die hier in erster Linie bestehende Störung ist bis heute noch nicht bekannt. Durch gute Fortschritte in der medikamentösen Behandlung des Diabetes mellitus ist diese Begleiterscheinung seltener geworden. Tierexperimentell ist ein Diabetes mellitus leicht mit Alloxan zu erzeugen. Von Gross, Harris und Bayer (1972) (7), sowie Younathan (1962) (39) zeigten, daß Alloxan einen zytotoxischen Effekt hat und den mitochondrialen Stoffwechsel der ß-Zellen des Pankreas stört. So sind auch die Veränderungen der Rattenovarien, die mit einer Alloxan-Behandlung erzielt wurden, schon mehrfach von verschiedenen Autoren untersucht worden (Howland, Zebrowski (1972) (10),

Stähler, Neumann, Niethammer (1974) (31) und andere).

Histologische Veränderungen in den Ovarien von Alloxan-diabetischen Ratten sind von Takewa und Kusheva (1972) (35) beschrieben worden. Amar und Oed (1966) (1) fanden eine funktionelle Insuffizienz der Corpora-lutea bei Alloxan-diabetischen Ratten.

Mit den erweiterten Erkenntnissen der Immunhistochemie und durch Extinktionsmessungen an entsprechend gefärbten Präparaten in der Ultraviolett-Mikrophotometrie wurde in der vorliegenden Arbeit die Human-Chorion-Gonadotropin-Rezeptoren in Ovarien Alloxan-diabetischer Ratten und nicht-Alloxan-diabetischer Ratten untersucht.

Zunächst fiel bei der Beobachtung der Ovarialgewichte auf, daß diese bei Alloxan-diabetischen Ratten (10 Tage nach Alloxan-Applikation) wesentlich geringer waren. Frank, Liu, Hsien S. Lin und Johnson (1972) (21) bestätigten diese Ergebnisse. Als mögliche Erklärung für diesen Effekt wird das Insulindefizit genannt, aber auch eine reduzierte Nahrungsaufnahme, bzw. Malnutrition als Ergebnis eines gestörten Protein-, Fett- und Kohlehydratstoffwechsels. Kaum Gewichtsunterschiede - im Vergleich zu den Ovarien unbehandelter Ratten - zeigten die Ovarialgewichte der Alloxan-diabetischen Ratten, die 22 Tage nach Alloxan-Applikation untersucht wurden. Hierbei wäre es denkbar, daß der länger bestehende Alloxan-Diabetes (Insulinmangel) eine Ovarialinsuffizienz bewirkt. Als Reaktion darauf werden in der Hypophyse vermehrt LH- und FSH-Releasing-Faktoren produziert, die das Ovarialwachstum stimulieren.

Eine stärkere Zunahme der Ovarial- und Körpergewichte ergab sich jedoch für die mit PMS und HCG stimulierten Ratten im Vergleich zu den mit Alloxan, PMS und HCG stimulierten Ratten (siehe Tabelle 2). Steelman und Pohley (1953) (32) beobachteten bereits vor längerer Zeit eine Zunahme des Ovarialgewichtes bei juvenilen, weiblichen Ratten, wenn FSH und HCG gleichzeitig gegeben wurde. Ausserdem bewirkte diese PMS- und HCG-Stimulation eine Steigerung der ovariellen Oestrogen-Produktion.

Im Interesse der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der HCG-Rezeptoren, die mit der Peroxidase-Reaktion und Benzidin-Färbung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht wurden (Petrusz, Uhlarik (1975) (25), Lengerke (1975) (19)).

Im immunhistologischen Bild zeigte sich im Allgemeinen eine Verminderung der durch Benzidin-Färbung (Peroxidase-Reaktion) nachgewiesenen HCG-Rezeptoren bei Alloxan-diabetischen Ratten. Besonders deutlich zeigte sich eine Verminderung der HCG-Rezeptoren in den Eizellen (um 12,2 niedrigere Extinktion) und in den Corpus-luteum-Zellen (um 10,4 niedrigere Extinktion) bei Alloxan-diabetischen Ratten im Vergleich zu den entsprechenden Ovarialzellen von Ratten, die nicht mit Alloxan behandelt worden waren (siehe Abbildung 5a).

Noch eindrucksvollere Unterschiede fanden sich im immunhistologischen Bild der Rattenovarien von Tieren, die 22 Tage nach Alloxan-Behandlung getötet wurden, im Vergleich zu Ovarien unbehandelter Ratten gleichen Alters. Hier zeigte sich eine Verminderung der Extinktion um 64,0 in den Eizellen und um 33,8 in den Thekazellen und um 21,5 in den Interstitiellzellen (siehe Abbildung 5c). Es

wäre sehr gut denkbar, daß hierbei die Zeitdauer des Diabetes für die Bindungskapazität von HCG, bzw. von HCG-Rezeptoren eine Rolle spielt. Es ist kaum zu bezweifeln, daß mit zunehmendem Alter der Ratten mehr HCG-Rezeptoren auf der Oberfläche der Ovarialzellen gebildet werden.

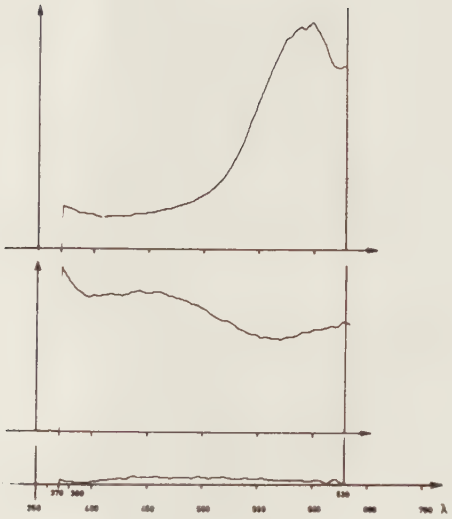
Im Vergleich zu normalen, unbehandelten Ratten zeigte sich eine Verminderung von HCG-Bindungsorten sowohl an allen Zellen stimulierter Rattenovarien, als auch an den Zellen stimulierter, Alloxan-diabetischer Rattenovarien, wobei die Zellen stimulierter, Alloxan-diabetischer Ratten noch eine geringere HCG-Bindungskapazität (HCG-Bindungsorte) aufwiesen, als die Zellen nur stimulierter Rattenovarien (siehe Abbildung 5b).

Die hormonelle Stimulation durch PMS und HCG bewirkt eine starke Vermehrung von Ovarialzellen und dadurch eine Zunahme des Ovarialgewichtes (siehe oben schon erwähnte Gewichtsunterschiede). Es besteht weiterhin jedoch die Annahme, daß durch PMS- und HCG-Stimulation lediglich das Zellwachstum gefördert wird, nicht aber die Anzahl der zellständigen HCG-Rezeptoren. Denkbar ist aber auch, daß durch die HCG-, bzw. PMS-Stimulation die HCG-Rezeptoren so verändert werden, daß diese nicht mehr in der Lage sind, HCG zu binden.

Die oben genannten Aussagen über Immunhistologie sind Ergebnisse, die durch Ultraviolett-Mikrophotometrie (UMSP) quantifiziert wurden. Hiermit ist tierexperimetell klar gezeigt worden, daß 1. durch Alloxan-Diabetes die HCG-Bindungsorte besonders in Eizellen und Corpus-luteum-Zellen stark vermindert sind, und daß 2. durch

PMS- und HCG-Stimulation diese Störung in den Ovarien nicht ausgeglichen werden kann.

Auf die Klinik bezogen würde dies bedeuten, daß man bei schlecht eingestellten Diabetikerinnen, die eine niedrige Konzeptionsrate haben können, durch PMS- und HCG-Behandlung keine Verbesserung ihrer Konzeptionsrate erhält.



a Zellkern

b Zytoplasma

c Untergund

Abbildung 1.

(a - c): Abhängigkeit der Extinktion von der Wellenlänge

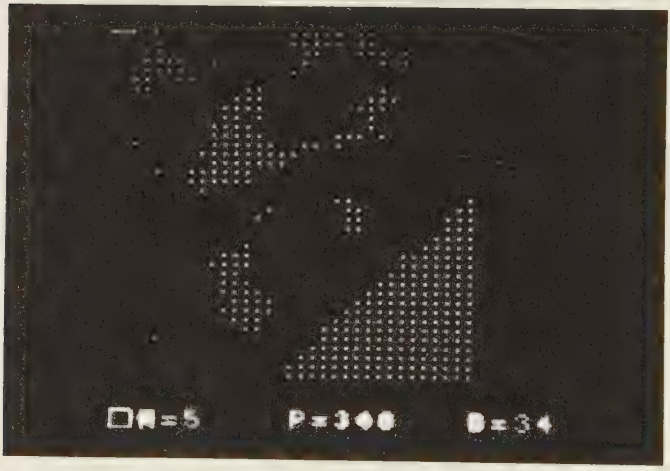
a) Im Zellkern ($\lambda_{Emax.}$ 580 - 600 nm)

b) Im Zytoplasma, bzw. einer Eizelle ($\lambda_{Emax.}$ 440 - 460 nm)

c) Im Untergrund gemessen.

Die entsprechenden Bereiche sind in der Abbildung 2 gekennzeichnet.

a_1 Absorption < 62



a_2 Absorption > 65

Abbildung 2 $a_{1,2}$

Darstellung der Einzelextinktionswerte einer Messung bei 455 nm (λ455nm) am Sichtgerät (Monitor) des Laborcomputers. Der Scanbereich ist in Abbildung 2b umrandet. Es sind alle Werte gezeigt, die eine Absorption >65% haben (a_2). Eine Diskrimination des Benzidin-Farbkomplexes ist gut möglich.

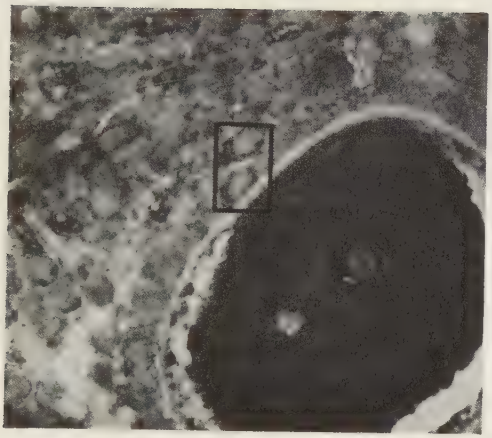


Abbildung 2 b

Mikrophotographie einer Eizelle und der Granulosa-Zellen im monochromatischen Licht. Umrandeter Bereich wurde gemessen (λ 455 nm).

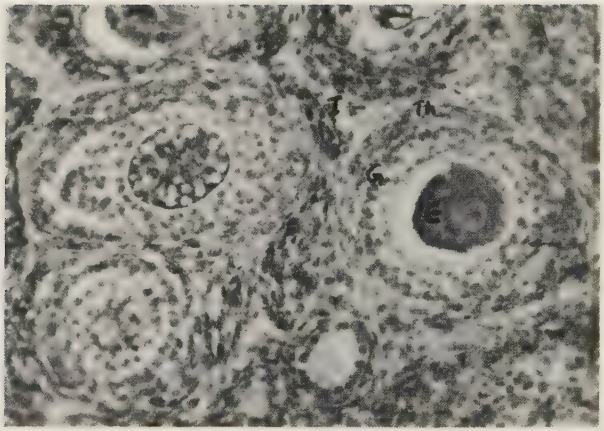


Abbildung 2 c.

Mikrophotographie eines Ovariumbereiches mit verschiedenen Meßbereichen entsprechend den Zellgruppen.

Wellenlänge $\sim$ 455 nm
E: Eizelle
G: Granulosa-Zelle
Th: Theka-Zelle
I: Interstitium

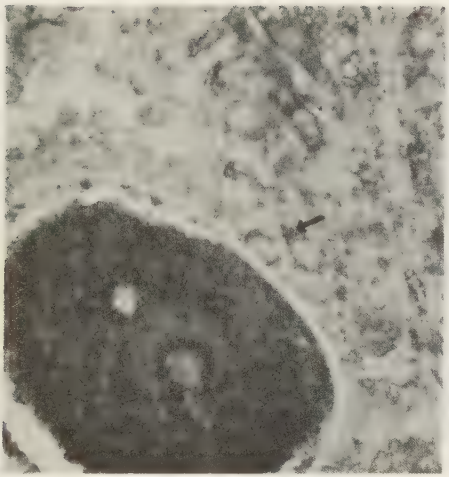


Abbildung 3 a.

zeigt deutlich in der Eizelle und im Zytoplasma der Granulosa-Zellen den spezifischen HP-Benzidin-Komplex als fein granulierten schwarzen Fleck im Zytoplasma der Einzelzelle und der Eizelle bei einer Wellenlänge von 455 nm photographiert.

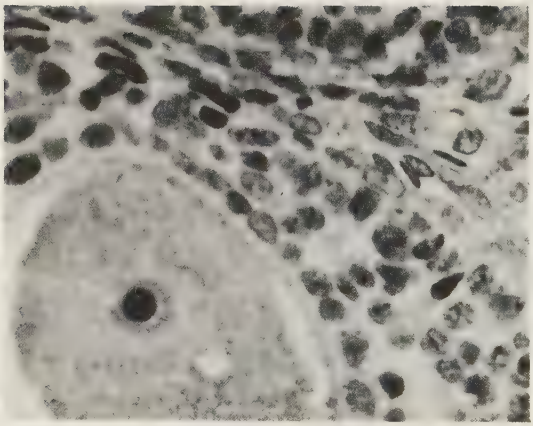


Abbildung 3 b.

zeigt denselben Bereich wie in Abbildung 3a, aber bei einer Wellenlänge von λ 590 nm photographiert. Hier ist die Toluidinblau-Färbung in dem Kern der Granulosa-Zellen und in dem Nucleolus der Eizellen dargerstellt.

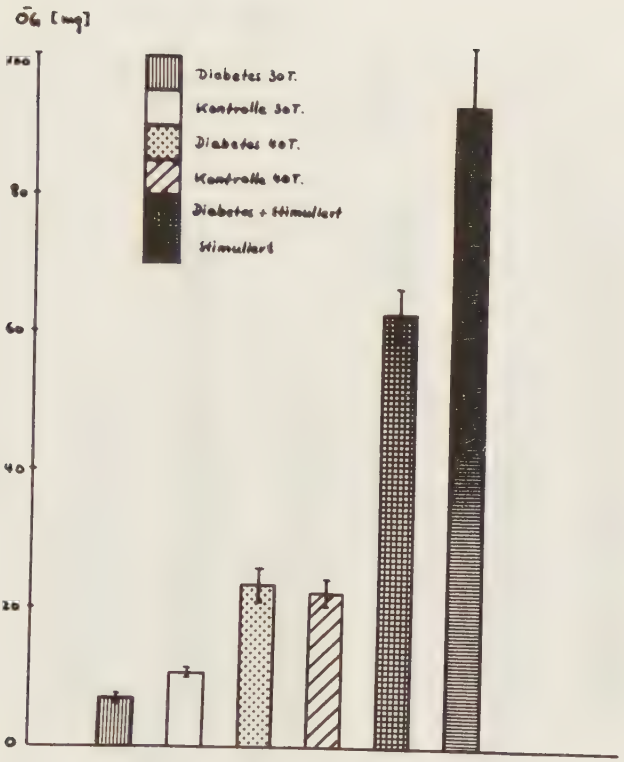


Abbildung 4.

Ovargewichte

Von 6 Versuchsgruppen sind die jeweiligen Mittelwerte der Ovargewichte dargestellt.

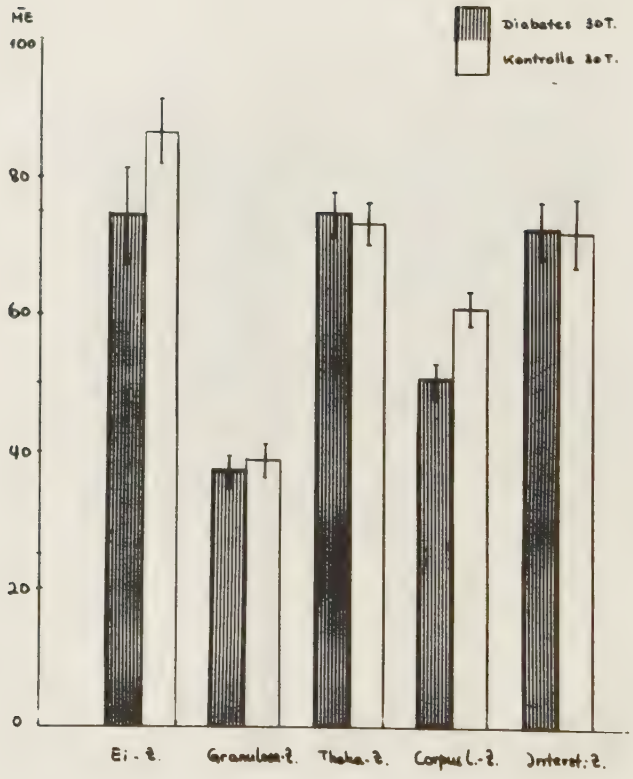


Abbildung 5 a.

Mittelwerte aus mehreren integral Extinktionsmessungen verschiedener Präparate und aus unterschiedlichen Bereichen der entsprechenden Zellgruppen in den Ovarien bei 30 Tage alten Alloxan-diabetischen Ratten im Vergleich zu 30 Tage alten nicht behandelten Ratten als Kontrolle.

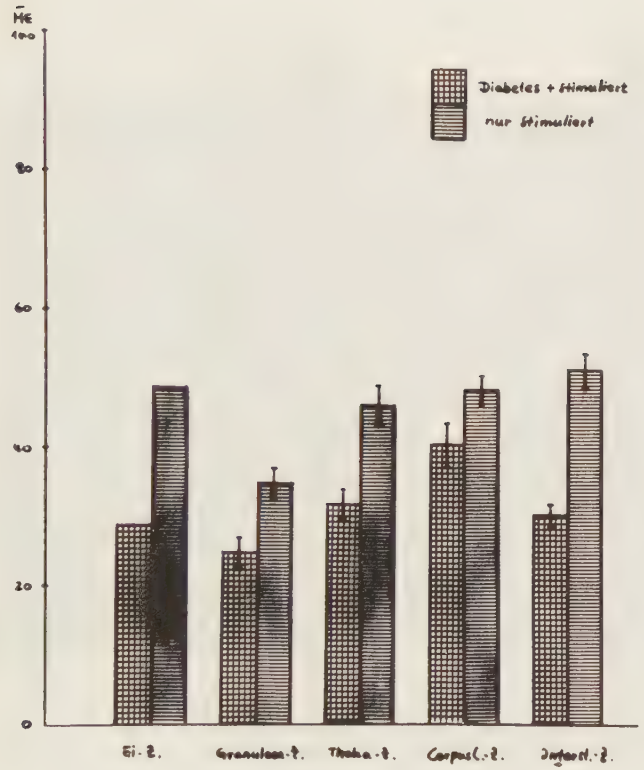


Abbildung 5 b.

Mittlere Extinktionswerte bei Alloxan-diabetischen, stimulierten Ratten im Vergleich zu nur stimulierten Ratten aus unterschiedlichen Bereichen der entsprechenden Zellgruppen in den Ovarien.

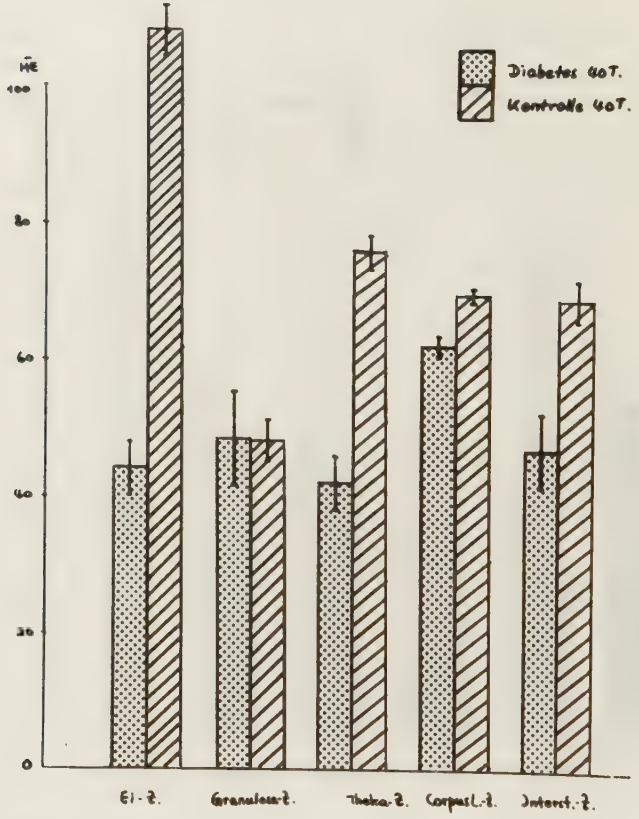


Abbildung 5 c.

Mittelwerte aus mehreren integral Extinktionsmessungen verschiedener Präparate und aus unterschiedlichen Bereichen der entsprechenden Zellgruppen in den Ovarien 40 Tage alter Alloxan-diabetischer Ratten im Vergleich zu 40 Tage alten nicht behandelten Ratten als Kontrolle.

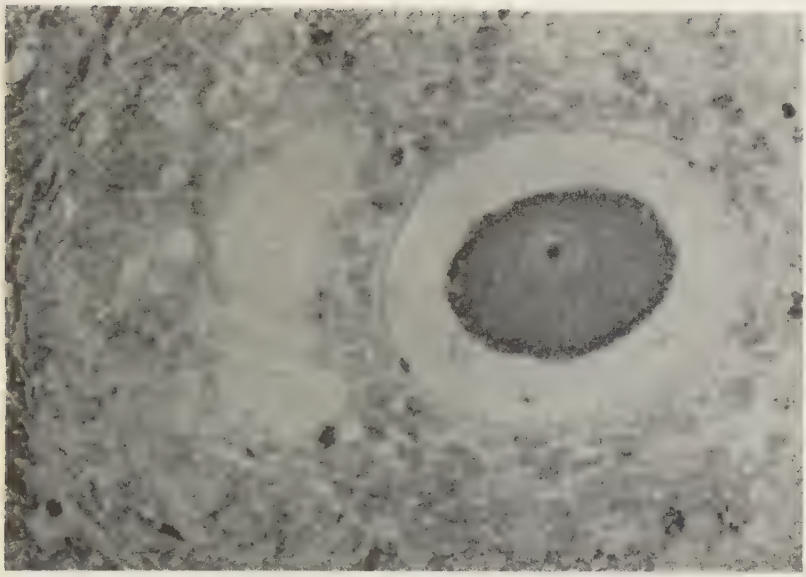


Abbildung 6.

Positive Eizelle mit negativem Nucleus, positive Theka und Granulosa folliculi sind sichtbar.

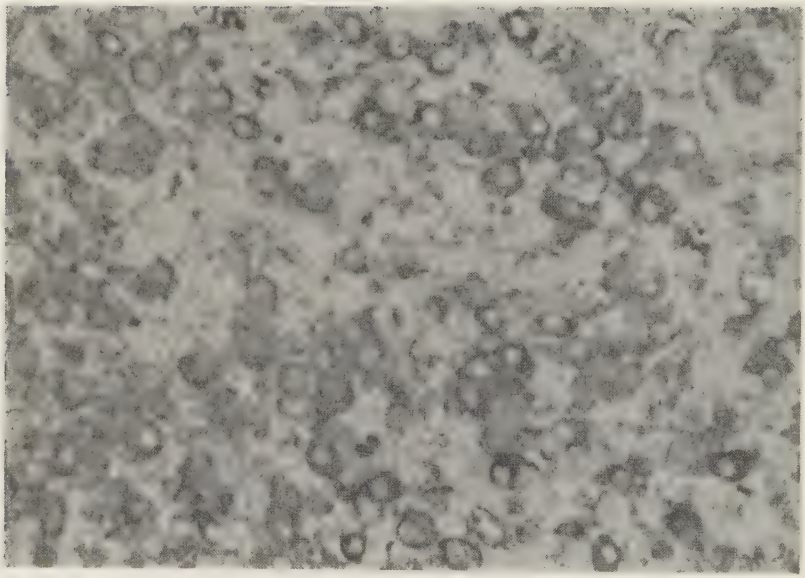


Abbildung 7.

Corpus-luteum eines normalen Rattenovars.

Positive Zellen erscheinen als dunkel gefärbte Bereiche mit feiner Granulierung im Zytoplasma.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Nachweis von HCG-Rezeptoren auf verschiedenen Arten von Ovarialzellen. Die Ovarien wurden 1. von normalen, gesunden Ratten, 2. von Alloxan-diabetischen Ratten, 3. von mit PMS und HCG (Human-Chorionic-Gonadotropin resp. Post-Menopausen-Serum) stimulierten Ratten und 4. von gleichfalls mit PMS und HCG stimulierten, Alloxan-diabetischen Ratten gewonnen. Der Nachweis dieser HCG-Rezeptoren erfolgte mit immunhistochemischen Methoden; dabei wurde ein gereinigtes HCG-Präparat, ein Anti-HCG-Globulin (Typ IgG), ein Anit-Kaninchen-Gamma-Globulin, eine Kaninchen-Anti-Peroxidase, sowie eine Pferde-Peroxidase (HP = Horseradish-Peroxidase) als Immunseren verwandt. Die Horseradish-Peroxidase wurde mit Benzidin histochemisch dargestellt. Ultraviolett-spektrophometrische Extinktionsmessungen ermöglichten nicht nur eine genaue Lokalisation der HCG-spezifischen Bindungsstellen, sondern auch eine quantitative Aussage über ihre Verteilung auf den verschiedenen Zellen. Es wurden hierbei Eizellen, Theka-Zellen, Corpus-luteum-Zellen, sowie Interstitiell- und Granulosa-Zellen untersucht.

Bei Ovarialzellen gesunder Ratten fand sich eine Abnahme von HCG-Bindungsorten in der eben beschriebenen Reihenfolge. Nach Alloxan-Behandlung der Ratten ergaben sich insgesamt niedrigere Werte für die HCG-Bindungsstellen bei ebenfalls abnehmender Tendenz in der obigen Zellsequenz.

Auf den Ovarialzellen mit PMS und HCG stimulierter Ratten ließ sich eine noch geringere Anzahl HCG-spezifischer Bindungsorte nachweisen. Ein absolutes Minimum solcher HCG-spezifischer Bindungsorte ergab sich für die Ovarien derjenigen Tiere, die nach einer Alloxan-Behandlung mit PMS und HCG stimuliert worden waren.

Neben diesen immunhistochemischen Untersuchungen wurden auch die Ovarialgewichte der oben beschriebenen 4 Tiergruppen registriert. Hierbei fiel auf, daß die Ovarien gesunder Ratten und solcher von Tieren, die nach 22 Tagen nach Alloxan-Applikation untersucht wurden, etwa gleich große Gewichte aufwiesen. Die Ovarien von Ratten, die bereits 10 Tage nach Alloxan-Applikation entnommen wurden, wiesen deutlich verminderte Gewichte auf. Ovarien der PMS- und HCG-stimulierten Ratten waren sowohl deutlich schwerer als die aller vorgenannten Tiergruppen, als auch die der PMS- und HCG-stimulierten, Alloxan-diabetischen Ratten.

Mit dieser Arbeit konnte tierexperimentell gezeigt werden, daß ovarielle HCG-Bindungsorte (insbesondere von Eizellen und von Corpus-luteum-Zellen) im Vergleich zu gesunden Tieren bei Alloxan-diabetischen Ratten vermindert sind. Es konnte ausgeschlossen werden, daß diese Beeinträchtigung der zellulären Rezeptoren-Dichte für HCG durch Behandlung der Alloxan-diabetischen Tiere mit PMS und HCG aufzuheben sei. Es wird die Beeinflußbarkeit der Konzeptionsrate schwer einstellbarer Diabetikerinnen durch PMS-, bzw. HCG-Stimulation diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AMAR, Ch. and DED, C.
Activity of corpora lutea in alloxan diabetic rats. A histochemical study. Acta Anat. 65, 299 - 302, 1966

2. BARTELS, P.H.
Sensitivity and Evolution of microspectrophotometric and microinterferometric measurements. Introduction to Quantitative Cytochemistry. Academic Press 1966

3. CATT, K.J., DUFAU, M.L. and TSURUHARA, T.
J. clin. Endocrinol 32, 860, 1971

4. CHANNING, C.P. and KAMMERMAN, S.
Characteristics of Gonadotrophin Receptors of Porcine Granulosa Cells during Follicle Maturation.
Endocrinology 92, 531, 1973

5. DE KRETSER, D.M., CATT, K.J. and PAULSEN, C.A.
Endocrinology 88, 332, 1971

6. FARINA, J.M.S., CHIERI, R.A., BASABE, J.C. and FOGLIA, V.G.
Response to Gonadotrophins in mature and immature diabetic female rats.
Fertility and Sterility Vol. 22, No. 12, December 1971

7. GROSS, M.D., HARRIS, S. and BEYER, R.E.
The effect of Streptozotocin-Induced Diabetes of Oxidative Phosphorylation and Related Reactions in Skeletal Muscle Mitochondria.
Hormone and metabolic research Vol. 4, No 1, January 1972

8. GOLDENBERG, REITER, E.O., VAITUKAITIS, J.L., ROSS, T.
Interaction of FSH and HCG on follicle development in the ovarian augmentation reaction.
Endocrinology 91, 533, 1972

9. GRAHAM Jr., R.C. and KARNOVSKY, M.J.
The early stages of absoption of injected Horseradish-Peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Vol. 14, N. 4, 1966

10. HOWLAND, B.E. and ZEBROSKI, E.J.
Hyposecretion of gonadotrophins in alloxan-treated male rats.
J. Repord. Fert. 31, 115 - 118, 1972

11. KENT, J.
Some histochemical changes in immature mouse ovaries after gonadotrophin treatment.
Unitedt Birmingham Hospitals, Department of clinical endocrinology.

12. KLEBANOFF, S.J. and GREENBAUM, A.L.
The effect of pH on the diabetogenic action of alloxan.
J. Endocrin. 11, 314 - 322, 1954

13. KIDWELL, W., BALOUGH Jr., K., WIEST, W.G.
Effect of luteinizing hormones on glucose-6-phosphatase and 20-d-hydroxsteroid-dehydrogenase activities in superovulated rat ovaries
Endocrinology 79, 352 - 361, 1966

14. KYRIAKOW, S. Y. and KUKU, N.J.
Lactogenesis in the diabetic rat
J. Endocrin. 59, 199 - 200, 1973

15. LEE, C.Y. and RYAN
The uptake of human luteinizing hormone (hLH) by slices of luteinized rat ovaries
Endocrinol. 89, 1515, 1971

16. LEE, C.Y. and RYAN
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 3520, 1972

17. LEE, C.Y and RYAN, R.J.
Interaction of ovarian Receptor with human luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin
Biochemistry Vol. 12, No. 23, 1973

18. LEE, C.Y., COULAM, C.B., JIANG, N.S. and RYAN, R.J.
Receptor for human luteinizing hormone in human corpora lutea tissue
J. Clin. Endocrinol. metab. 36, 148, 1973

19. LENGERKE, A.
Veränderungen in der HCG-Bindungsfähigkeit von Rattenovarien unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.
1975

20. LEYENDECKER, G., WIEDT, L. and NOCKE, W.
Radioligand receptor assay for the determination of LH and HCG activities utilizing rat ovarian receptor.
Acta endocrin. Suppl. 173 (1973) 62

21. LIU, V., FRANK, T., HSIEN, S.L. and JOHNSON, D.C.
Serum FSH, LH and the ovarian response to exogenous gonadotrophins in alloxan diabetic immature female rats.
Endocrinology 91, 1172, 1972

22. MASON, T.E., PHIFER, R.F., SPICER, S.S.
An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Vol. 17, No 9, 1969

23. NAKANE, P.K. and PIERCE, G.B.J.R.
Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localisation of tissue antigen.
J. Cell. Biol. 33, 307, 1967

24. OSTER and POLISTER
Physical Thechniques in Biological Research
Bd. III Alls and Tissues, Ac. Press N.Y. 1956

25. PETRUSZ, UHLARIK, A.
Light microscopic localisation of Binding sites for human chorionic gonadotrophin in luteinized rat ovaries by a Peroxidase-labeled antibody method.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Vol 21, No. 3, 279 - 282, 1973

26. RAO, Ch.V. and SAXENA, B. B.
Gonadotrophin receptor in the plasmamembranes of rat luteal cells
Biochemica et Biophysica Acta, 313 (1973) 372 - 389

27. RAO, Ch. V.
Properties of gonadotrophin receptor in the cellmembranes of bovine corpus luteum
The Journal of Biological Chemistry
Vol. 249, No. 9, 2864 - 2872, 1974

28. RERUP, C.C.
Drug producing diabetes through damage of the insulin secreting cells.
Pharma. Rev. 22, 485, 1970

29. SABA, G.C. and HOET, J.J.
The effect of alloxan on the adrenal cortical secretion in male rats.
Acta endrocrin. Copenh. 40, 349, 1962

30. SANDRITTER, W.
Einleitung zu den Problemen der Zytophotometrie
Acta Histochemica Suppl. VI, 1965

31. STÄHLER, E., NEUMANN, H.O., NIETHAMMER, K.M.
Metabolism and ultrastructure in the ovaries of alloxan-diabetic juvenile rats.

32. STEELMAN, S.L. and PHOLEY, F.M.
Endocrinology 53, 604, 1953

33. STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H.
The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of Spirochetes.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry
Vol. 18, No. 5, 1969

34. STERNBERGER, L. A.
Some new developement immunocytochemistry
Mikroskopie Bd. 25, 346 - 361, 1969

35. TAKEWA, Z. and KUSHEVA, R.
Histological and histochemical studies of ovaries of white rates treated with alloxan and those of women who died od diabetic coma.
Folia histochemica et cytochemica Vol 10, No. 4, 325 - 332, 1972

36. VAITUKAITIS, J.L., ROSS, G. T. and REICHERT, J.R.
Immunologic and biologic behavior of HCG and Bovine LH subunit hybrids
Endocrinology 92, 411, 1973

37. VAZQUES, E., HERNANDES, C., RODRIGUEZ, R., FLORES, F. and GONZALES, G.
Experimental study of the inhibition of HCG action on the ovary by contraceptive and other steroids.
Reprint from Excerpta Medica international congress series No. 157

38. VAZQUES, E., GOMEZ DAZA, L.
Sitia de accion dela HCG en et ovario de la rata, determinando por un metodo immunohistogiumico.
Revista de investigacion clinica 18, 239, 1966

39. YOUNATHAN, E.S.
Inhibition of the citric acid cycle by alloxan
J. Biol. Chem. 237, 608 - 611, 1962

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Uhlarik
für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung
bei der Durchführung der Arbeit, Herrn Priv. Doz. Dr. Seibold
für die Hilfe bei den Extinktionsmessungen und auch
Herrn Dr. med. U. Bogdahn, der mir bei dem schriftlichen
Teil sehr geholfen hat.

L E B E N S L A U F

Geboren am 11. Juli 1950 in Surabaja (Indonesien) als Tochter des Choi-Wing Kwok und seiner Ehefrau Dr. med. Sioe-Moi Kwok.
Einschulung 1955 in Surabaja.
Besuch der Santa-Maria-Schule (Surabaja), Gymnasium für Mädchen ab 1962.
Abiturzeugnis 1967.
Seit Februar 1968 bin ich in Deutschland.
Besuch der Ricarda-Huch-Schule, Giessen, Gymnasium für Mädchen ab September 1968.
Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife im Juni 1970.
Studienbeginn Wintersemester 1970/1971 an der Philipps-Universität , Marburg a.d. Lahn
Studienfach: Humanmedizin
Zwischenprüfungen: Vorphysikum - Herbst 1971
Physikum - Frühjahr 1973
Staatsexamen: 22. Juli 1976 in Marburg a.d. Lahn

1. Medizinalassistentenzeit vom 1. Oktober 1976 bis 31. Januar 1977 in der Medizinischen Universitäts-Klinik, Heidelberg
2. Medizinalassistentenzeit vom 1. Februar 1977 bis 30. November 1977 in der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Miltenberg a. Main.

Meine Hochschullehrer waren:

Amon, Buchholz, Castenholz, Daume, Dehnicke,
Dimroth, Dittrich, Eisner, Exner, Friedrich,Ganz,
Golenhofen, Haberich, Hamelmann, Hensel, Horth,
Jakob, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Kleinsasser,
Kocke, Koransky, Linneweh, Maroske, Martini,
Nultsch, Petry, Pots, Portig, Riecken, Rodeck,
Rohen, Siegert, Spalke, Straub, Troidl, Uhlarik,
Walcher, Willenbockel, Hildebrand.